TRINITROPHENYL- UND LPS-BELADENE ERYTHROZYTEN ALS MODELL EINER ANTIKÖRPERUNABHÄNGIGEN KOMPLEMENT-AKTIVIERUNG DES "KLASSISCHEN WEGES"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

bei den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen

der Johannes Gutenberg-Universität

zu Mainz

(Fachbereich Pharmazie)

Rolf Thesen

geb. in Kenn

Mainz 1978

Dekan: Prof. Dr. W. Schunack

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Loos

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Schunack

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs zum Druck gekürzt.

Ein Exemplar der ungekürzten Arbeit liegt in der Universitätsbibliothek vor.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Das aus 11 Serumproteinen bestehende Komplementsystem stellt für den Warmblüterorganismus ein wichtiges Schutz- und Abwehrsystem gegenüber eingedrungenem Fremdmaterial dar. Diese biologischen Leistungen, die durch Aktivierung der 11 Komplementfaktoren frei werden, lassen sich mit Entzündungsvermittlung sowie im Falle von zellulären Bestandteilen mit Infektabwehr umschreiben.

Das Komplementsystem kann auf zwei verschiedenen Wegen aktiviert werden. Antigen-Antikörperkomplexe (Ag-Ak) führen zu einer Aktivierung der Komplementfaktoren über den "Klassischen Weg" in der Reaktionssequenz C1-C4-C2-C3-C5-C6-C7-C8-C9. C1 ist ein aus den 3 Untereinheiten C1q, C1r und C1s bestehendes Makromolekül. C1q trägt die Bindungsstelle zum "aktivierten Fc-Stück" des Antikörpers, während C1s, die sogenannte C1-Esterase, die eigentliche enzymatische Aktivität des C1-Moleküls gegenüber den in der Sequenz folgenden Komponenten C4 und C2 darstellt.

Eine Aktivierung über den sogenannten "Alternativen Weg" erfolgt dagegen ohne Beteiligung von Antikörpern sowie der Komponenten C1, C4 und C2; an deren Stelle treten verschiedene Faktoren des Properdinsystems sowie bestimmte Induktoren, die meist negative Ladungen tragen.

In neuerer Zeit konnte gezeigt werden, daß verschiedene dieser Induktoren des "Alternativen Weges", wie z.B. Dextransulfat sowie mit Dinitrophenylgruppen besetztes Humanserum-Albumin (DNP-HSA) und verschiedene Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien auch mit C1, der ersten Komplementkomponente, reagieren können. Dabei beschränkt sich die Reaktion dieser Substanzen mit C1 im Falle von LPS und DNP-HSA lediglich auf die C1-Unterkomponente C1q.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob diese direkte, antikörperunabhängige Reaktion von LPS bzw. DNP- oder TNP-Gruppen mit C1q auch zu einer intramolekularen Aktivierung des C1-Moleküls führt, wie sie normalerweise nur von Antigen-Antikörperkomplexen ausgelöst wird.
Ähnlich dem Modell der Immunhämolyse wurden in der vorliegenden Arbeit Erythrozyten (E) als Träger für die LPS- oder DNP- bzw. TNP-Gruppen eingesetzt.

E-TNP als Modell einer antikörperunabhängigen Aktivierung des "Klassischen Weges"

Eine ausreichende Beladung der Erythrozyten mit TNP-Gruppen erfolgte nur bei Verwendung der sehr reaktiven TNP-Sulfonsäure (TNP-S.) als Kupplungsreagenz. Die Beladungsdichte war abhängig von der Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur, sowie von der Konzentration der TNP-S. Verschiedene Methoden, die Anzahl der zellgebundenen TNP-Gruppen zu bestimmen, führten zu keinem verwertbaren Ergebnis. Bei einem der Quantifizierungsversuche zeigte es sich aber, daß bei der Inkubation von E mit TNP-S. außer E-TNP auch TNP-Proteinkomplexe entstanden, die aus der Erythrozytenmembran stammten und im Vergleich zu freier TNP-S. eine sehr starke C1-Hemmung zeigten.

E-TNP konnten durch Inkubation mit Serum lysiert werden; dies gelang sowohl mit homologem, autologem oder gründlich absorbiertem heterologem Serum. Das Ausmaß der Lyse war direkt abhängig von der Serumkonzentration sowie von der Inkubationstemperatur und Inkubationsdauer. Die Hämolyse war allein von der Aktivierung der "Klassischen Komplementsequenz" abhängig. Dies konnte aus folgenden Beobachtungen geschlossen werden :

1. Bei Verwendung eines C4 defekten Meerschweinchen-Serums (C4d MS) unterblieb die Hämolyse völlig; sie erfolgte erst wieder nach Zugabe von gereinigtem C4.
2. EDTA und EGTA verhinderten in vergleichbaren molaren Konzentrationen die Hämolyse von E-TNP.
3. Die Hämolyse konnte nur in Anwesenheit von C1q erfolgen.

Die Interaktion zwischen E-TNP und dem Komplementsystem erfolgt unabhängig von Antikörpern ; denn E-TNP lysierten auch nach sukzessiver Inkubation mit gereinigten Komponenten. Es konnten Intermediärkomplexe, wie E-TNP $C\overline{1}$, E-TNP $C\overline{14}$ etc. mit gereinigtem Komplementkomponenten aufgebaut und nachgewiesen werden.

In einem $C\overline{1}$-Transfertest wurde im Vergleich zu EA zwar weniger $C\overline{1}$ an E-TNP gebunden; das gebundene $C\overline{1}$ konnte jedoch vollständig auf EAC4 transferiert werden. E-TNP führte wie EA temperaturabhängig zu einer intramolekularen Aktivierung von nativem C1.

E-LPS als Modell einer antikörperunabhängigen Aktivierung des "Klassischen Weges"

Von verschiedenen Lipopolysacchariden zeigte LPS von Salmonella minnesota R 595 die stärksten $C\overline{1}$-hemmenden Eigenschaften. Lediglich Erythrozyten, die mit diesem Präparat reagiert hatten, konnten in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration durch homologes Serum lysiert werden. Die Beladung der Zellen und damit ihre Komplementempfindlichkeit nahm mit steigender Temperatur und Inkubationsdauer zu. Das Ausmaß der komplementbedingten Hämolyse nahm in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur zu. Wie bei E-TNP war auch im Falle von E-LPS die Lyse allein von einer Aktivierung des "Klassischen Weges" abhängig; zusätzlich konnte jedoch eine direkte C3-Aktivierung durch E-LPS gezeigt werden.

Durch Inkubation von E-LPS mit gereinigtem $C\overline{1}$ konnte zwar ein E-LPS · $C\overline{1}$-Komplex aufgebaut werden, der aber, obwohl er C4 und C2 umsetzen konnte, nach Reaktion mit den restlichen Komplementkomponenten nicht lysiert wurde. Von dem an E-LPS gebundenen $C\overline{1}$ konnte nur ein geringer Prozentsatz in einem $C\overline{1}$-Transfertest auf EAC4 transferiert werden, was auf eine sehr große Affinität der LPS-Gruppen zu $C\overline{1}$ hinweist.

Mit Hilfe dieser beiden Modelle konnte demnach gezeigt werden, daß nicht nur Antigen-Antikörperkomplexe C1 und damit die "Klassische Komplementsequenz" aktivieren können. Auch negativ geladene Substanzen wie Lipopolysaccharide oder TNP-Gruppen sind in der Lage, direkt, antikörperunabhängig mit C1 zu reagieren und dieses zu aktivieren.

Diese unspezifische, nicht durch Antikörper vermittelte C1-Aktivierung könnte besonders in der Präimmunphase, in der der Organismus noch keine gegen ein eingedrungenes Bakterium gerichtete Antikörper bilden konnte, eine Rolle spielen. Auf diese Möglichkeit einer "natürlichen Abwehr" weisen auch neuere Arbeiten hin, die zeigen, daß gramnegative Bakterien wie z.B. E. coli in der Lage sind, direkt, d.h. antikörperunabhängig C1 zu aktivieren. Auch bestimmte RNA-Viren führen in Abwesenheit von antiviralen Antikörpern zu einer Aktivierung der "Klassischen Komplementsequenz" und werden auf diese Weise von Serum lysiert. Zur weiteren Aufklärung dieser antikörperunabhängigen C1-Aktivierung könnten die an den beiden Modellen gefundenen Erkenntnisse hilfreich sein.

Lebenslauf

Am 8. Februar 1950 wurde ich als Sohn des Schmiedemeisters Ludwig Thesen und seiner Ehefrau Anni, geb. Schneider, in Kenn bei Trier geboren. Vom Jahre 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in Kenn, anschließend das Friedrich-Wilhelm-Gymnasium in Trier, wo ich im Juni 1968 das Abitur ablegte. Von 1968 bis Mitte 1970 war ich als Praktikant in der Bahnhof - Apotheke in Trier beschäftigt. Am 25. Juni 1970 legte ich in Trier das Pharmazeutische Vorexamen ab und arbeitete anschließend noch ein halbes Jahr in der Bahnhof-Apotheke zu Trier als Vorexaminierter. Zum Sommersemester 1971 begann ich mein Studium in Pharmazie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz und legte dort am 16. Oktober 1974 mein Staatsexamen ab. Danach arbeitete ich in verschiedenen Apotheken und begann - nach längerer Krankheit infolge eines Unfalles - im Dezember 1975 mit der Anfertigung einer Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Die Promotion erfolgte am 14. Juli 1978. Seit Oktober 1975 bin ich mit der Krankenschwester Christine Thesen, geb. Boltze, verheiratet.